

Dosage immunoenzymatique des gliadines

On se propose de tester un dosage immunoenzymatique en phase hétérogène des gliadines par une technique ELISA dite « test par capture de l'anticorps avec quantification des antigènes par compétition antigénique ».

Un support de plaque de microtitration est fourni avec des barrettes à fond plat.

1. Sensibilisation des barrettes : « coating »

Les barrettes 1 et 2 doivent être préalablement traitées comme suit :

- à l'exception des puits A1 et B1 (contenant 100µL de PBS), dépôt de 100µL de gliadines à 100µg/mL, incubation de 90 minutes à 37 °C des barrettes recouvertes d'un film auto-adhésif puis 2 rinçages des puits avec du tampon PBS

2. Saturation des sites

- à l'exception du puits A1 (dépôt de 300µL de PBS), dépôt de 300µL de SAB à 3% en tampon PBS, incubation 90 minutes à 37°C des barrettes recouvertes d'un film auto-adhésif puis 2 rinçages des puits avec du tampon PBS .

3. Préparation de la gamme

- à partir de la solution de gliadines fournie à 1mg/mL, réaliser 11 dilutions en série de progression géométrique de raison 2, sous un volume de 200µL, en utilisant comme diluant du tampon SAB-PBS-Tween. Utiliser pour ces dilutions les barrettes vides installées en positions 11 et 12 du support.

- distribuer 50µL de chacune de ces dilutions dans les puits D1 à F2 en commençant par la dilution au 1/2.

- distribuer 50µL de diluant dans les puits A1, B1 et C1.

- distribuer dans les puits G2 et H2 respectivement 50µL d'extrait A et 50µL d'extrait B.

4. Réaction immunoenzymatique

- distribuer ensuite dans chacun des puits, à l'exception du puits A1, 50µL de conjugué Ac-POD 1/200.

- homogénéiser doucement le contenu de chaque puits par aspiration-refoulements et changer de cône pour chaque puits

- recouvrir les 2 barrettes d'un film auto-adhésif et incubé à 37°C pendant l'heure

- effectuer ensuite 2 lavages par du tampon PBS-Tween et 1 rinçage par du tampon PBS.

Pour chaque lavage ou rinçage, remplir chacun des puits à l'aide d'une pissette contenant le tampon. Vider ensuite les puits par retournement brusque au dessus d'un évier. Après rinçage, égoutter les puits par tapotements des barrettes sur des feuilles de papier filtre.

- distribuer ensuite dans tous les puits 100µL de solution de substrat ABTS-H₂O₂ 0,015%. Recouvrir d'un film auto-adhésif et incubé 30 minutes à l'étuve à 37°C.

- lire après incubation les absorbances de chaque puits à 405nm contre le puits A1 dans un lecteur de microplaques à lecture automatique avec imprimante.

5. Résultats compte rendu

- Préciser sous forme d'un schéma légende le principe du dosage des gliadines réalisé.

- Préciser le rôle des puits A1, B1 et C1 et discuter les résultats obtenus pour ces puits.

- Résumer sous forme d'un tableau la composition et le traitement des différents puits, indiquer les concentrations en gliadines pour les puits D1 à F2, l'absorbance_{405nm} mesurée et le rapport absorbance mesurée / absorbance du puit C1.

- tracer le graphe absorbance mesurée / absorbance du puit C1 = f(log concentration en gliadines exprimée en µg/mL).

- Évaluer les concentrations en gliadines des échantillons A et B fournis.